

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 juillet 2003 (31.07.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/062247 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **C07F**
(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/00129

Joël [FR/FR]; 159, boulevard de Mondétour, F-91400 Orsay (FR). **GEORGIADIS, Dimitri** [GR/GR]; Iraclitou 53, Archarnai, Athènes (GR). **DIVE, Vincent** [FR/FR]; 13, rue des Pêcheurs, F-91120 Palaiseau (FR).

(22) Date de dépôt international :
16 janvier 2003 (16.01.2003)

(74) Mandataire : **LENOIR, Sophie**; c/o BREVATOME, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

(25) Langue de dépôt : français

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/00599 18 janvier 2002 (18.01.2002) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **COM-MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE** [FR/FR];
31/33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR).

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),

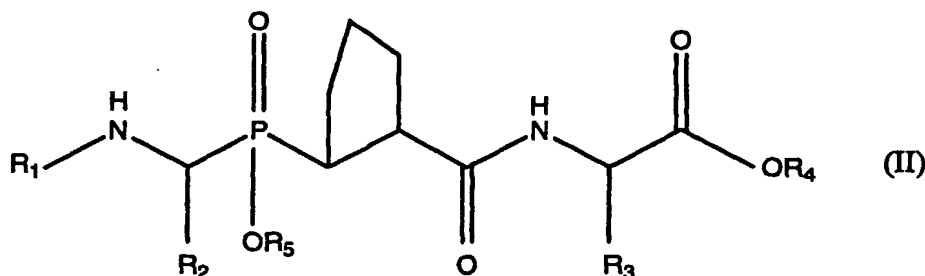
(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **COTTON,**

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: PHOSPHINIC PSEUDO-PEPTIDE DERIVATIVES FOR SELECTIVE INHIBITION OF THE ACTIVE C-TERMINAL SITE OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (I) (ACE)

(54) Titre : DÉRIVÉS DE PSEUDO-PEPTIDES PHOSPHINIQUES POUR L'INHIBITION SÉLECTIVE DU SITE ACTIF C-TERMINAL DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE I (ACE)



(57) Abstract: The invention relates to the use of phosphinic pseudo-peptide derivatives for production of a medicament for the selective inhibition of the active C-terminal site of angiotensin converting enzyme (I). Said derivatives are of formula (II), where, R₁ = optionally a normal protective group for amino functions in peptide chemistry or an amino acid or a peptide protected by the above type of protective group, R₂ and R₃ = a natural or synthetic amino acid side chain and R₄ and R₅ = a hydrogen atom or a counter-ion. The above finds application in the prevention and treatment of cardiovascular disease in humans.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation de dérivés de pseudo-peptides phosphiniques pour la préparation d'un médicament capable d'inhiber sélectivement le site actif C-terminal de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I. Ces dérivés répondent à la formule suivante : (1) dans laquelle :- R₁ peut-être un groupement protecteur usuel des fonctions amines en chimie peptidique, ou un acide aminé ou un peptide protégé par ce même type de groupements protecteurs, - R₂ et R₃ correspondent à une chaîne latérale d'acide aminé naturel ou non naturel, et- R₄ et R₅ représentent un atome d'hydrogène ou un contre-ion. Applications : prévention et traitement de pathologies cardiovasculaires chez l'homme.

WO 03/062247 A2



brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Publiée :

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport*

DERIVES DE PSEUDO-PEPTIDES PHOSPHINIQUES POUR
L'INHIBITION SELECTIVE DU SITE ACTIF C-TERMINAL DE
L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE I (ACE)

5

DESCRIPTION

Domaine technique

La présente invention a pour objet
l'utilisation de dérivés de pseudo-peptides
10 phosphiniques pour la préparation d'un médicament pour
inhiber sélectivement le site actif C-terminal de
l'enzyme de conversion de l'angiotensine I humaine
(ACE), c'est-à-dire sans affecter le site actif N-
terminal de l'ACE.

15 Un tel médicament est susceptible d'être
utilisé dans la prévention et le traitement de
différentes pathologies cardiovasculaires chez l'homme.

La présente invention a également pour objet
des dérivés de pseudo-peptides phosphiniques nouveaux,
20 des compositions pharmaceutiques les contenant, ainsi
que des procédés de préparation desdits dérivés de
pseudo-peptides phosphiniques.

Etat de la technique antérieure

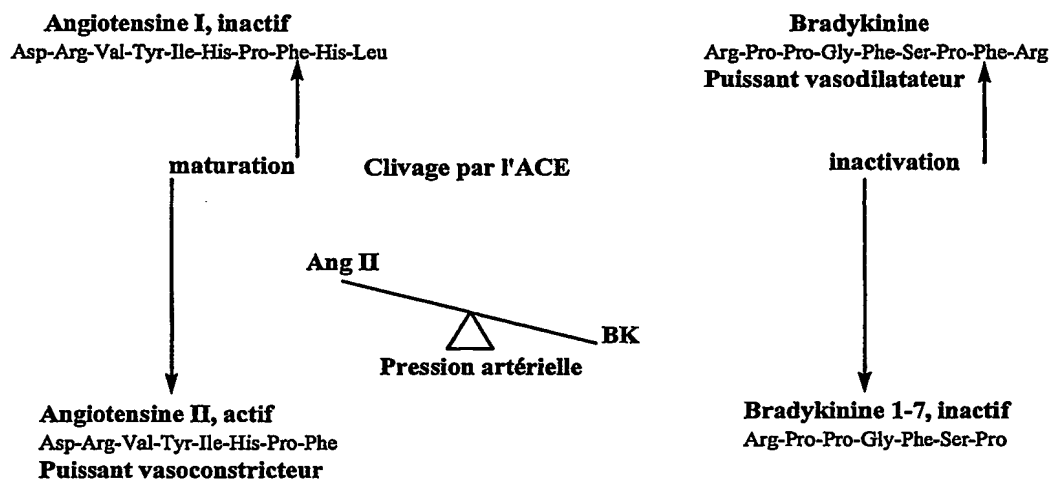
25 L'enzyme de conversion de l'angiotensine I
(ACE) est un acteur central de la régulation de la
pression artérielle et de l'homéostasie des différentes
fonctions physiologiques du tissu cardiovasculaire. Ces
actions semblent en partie dépendre :

30 - de la maturation d'un puissant vaso-
constricteur, l'angiotensine II, par clivage de

l'extrémité C-terminale de l'angiotensine I, peptide inactif, par l'ACE, et

- de la dégradation par l'ACE d'un puissant vasodilatateur, la bradykinine.

5 Ces actions sont illustrées ci-dessous.



L'hypertension artérielle, mais aussi les
10 maladies du tissu cardiaque, résultent d'une
dérégulation des différentes hormones vaso-
constrictives. Rétablir l'équilibre entre agents
vasoconstricteurs et vasodilatateurs, au profit de ces
derniers, est un des principaux objectifs
15 thérapeutiques des médicaments utilisés en clinique
humaine pour remédier à l'hypertension artérielle et
aux maladies du tissu cardiaque. On comprend, ainsi,
comment l'inhibition de l'ACE peut participer à ces
objectifs, en empêchant la formation de l'angiotensine
20 II et en potentialisant la bradykinine. Les inhibiteurs
de l'ACE sont utilisés en clinique humaine, non
seulement pour réduire l'hypertension artérielle, mais

aussi pour préserver les fonctions du tissu cardiaque, comme décrit dans les références [1] et [2].

Le clonage de l'ACE, puis la détermination de sa structure primaire, ont montré de façon surprenante la présence de deux sites actifs dans cet enzyme, comme décrit dans la référence [3]. Par mutagénèse dirigée, il a pu être prouvé que ces deux sites actifs sont parfaitement fonctionnels, c'est-à-dire capables de cliver des substrats physiologiques de l'ACE, tels que l'angiotensine I et la bradykinine (références [4] et [5]).

Malgré tous les travaux réalisés depuis plus de vingt ans sur l'ACE, on ne sait toujours pas si la présence de deux sites actifs dans l'ACE de mammifères, résultant d'une duplication d'un gène ancestral, correspond à un rôle fonctionnel particulier. Cependant la découverte récente, qu'*in vivo*, chez l'homme, le peptide Ac-SDKP (N-acétyl Ser-Asp-Lys-Pro) est essentiellement clivé par le site actif N-terminal de l'ACE, milite en faveur d'un rôle fonctionnel distinct pour chacun des sites actifs de l'ACE (référence [6]).

Ces considérations ont conduit les chercheurs à tenter de développer des inhibiteurs capables de discriminer de façon hautement sélective les deux sites actifs de l'ACE, afin de disposer d'outils pouvant permettre d'établir *in vivo* le rôle fonctionnel de chacun des sites de l'ACE.

A cet égard, il est important de souligner que tous les inhibiteurs utilisés à ce jour en clinique sont des inhibiteurs mixtes de l'ACE, c'est-à-dire qui bloquent simultanément les deux sites actifs de l'ACE.

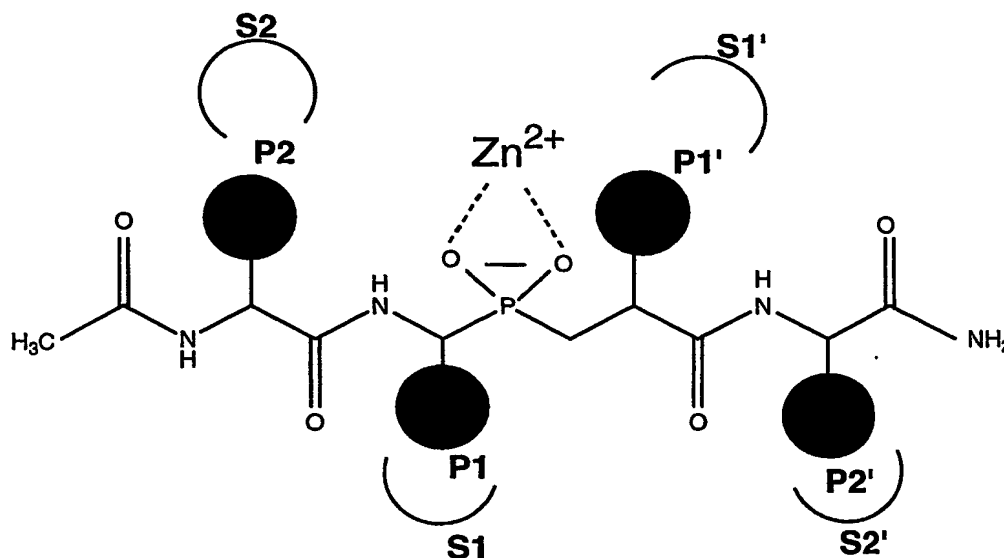
On a mis au point récemment le premier inhibiteur bloquant de façon sélective le site N-terminal de l'ACE, le RXP407 qui est un pseudo-peptide phosphinique (références [7] et [8]). Cet inhibiteur, non métabolisé chez le rat et la souris, est, par ailleurs, capable d'inhiber la dégradation du peptide N-acétyl Ser-Asp-Lys-Pro (Ac-SDKP) *in vivo* chez la souris (référence [9]). Ainsi, l'injection de RXP407, en bloquant le site N-terminal de l'ACE, empêcherait *in vivo* la dégradation de l'Ac-SDKP.

Cet inhibiteur fait l'objet d'une étude pré-clinique chez cet animal, visant à démontrer son utilité pour protéger le tissu hématopoïétique lors de traitements de chimiothérapie.

Par contre, aucun inhibiteur capable de discriminer les deux sites actifs de l'ACE en interagissant essentiellement avec le site C-terminal de l'ACE n'a été décrit à ce jour. Pourtant, il serait souhaitable de disposer de tels inhibiteurs. En effet, outre leur intérêt en recherche expérimentale et clinique, ils présenteraient l'avantage majeur, par rapport aux inhibiteurs mixtes classiques de l'ACE, de ne pas interférer avec les fonctions physiologiques liées à l'activité du site N-terminal de l'ACE, comme le métabolisme du peptide Ac-SDKP.

Il a été démontré que les peptides phosphiniques représentent une famille générique de composés capables d'inhiber, de façon très puissante, les métallopeptidases à zinc, famille de peptidases à laquelle appartient l'ACE, comme on peut le voir dans les références [9] à [16]. Dans ces composés, le rôle

du groupe PO_2^- est d'interagir avec l'atome de zinc situé dans le site actif de ces enzymes.



5

Outre la présence du groupe PO_2^- , la nature chimique des résidus P2, P1, P1' et P2' joue un rôle déterminant pour assurer la sélectivité des interactions entre un peptide phosphinique particulier et une métallopeptidase à zinc donnée (voir références [8], [12] et [13]). Ainsi, la présence de résidus bien particuliers dans les positions P2, P1, P1' et P2' permet d'obtenir des inhibiteurs sélectifs, n'inhibant que certaines métallopeptidases à zinc. Une telle sélectivité peut être un facteur essentiel dans le cadre d'une utilisation *in vivo* de ces inhibiteurs. En effet, on estime que la toxicité *in vivo* de certains inhibiteurs est en grande partie due à leur manque de sélectivité pour une cible donnée.

20

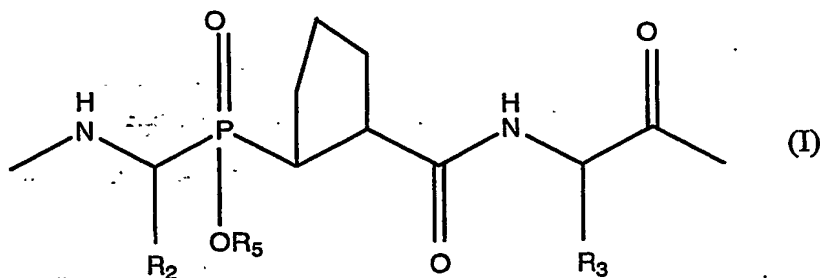
Selon ces principes, la recherche d'inhibiteurs capables de bloquer sélectivement le site C-terminal de

l'ACE a consisté à identifier dans la famille des composés phosphiniques, des résidus particuliers, situés dans les positions P1, P1' et P2', conférant aux inhibiteurs une capacité à interagir sélectivement avec le site C-terminal de l'ACE.

Exposé de l'invention

Ces recherches ont conduit à découvrir que la présence d'un résidu pseudo-proline dans des pseudo-peptides phosphiniques constitue un élément essentiel pour obtenir des inhibiteurs sélectifs du site C-terminal de l'ACE.

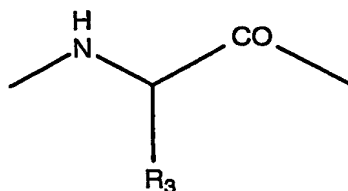
Aussi, la présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un dérivé de pseudo-peptide phosphinique comportant la séquence d'acides aminés de formule (I) suivante :



20 dans laquelle :

- R₂ et R₃, qui sont identiques ou différents, représentent la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, l'ensemble :

7



pouvant aussi former le résidu Pro (proline), et

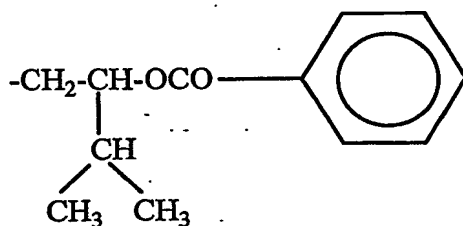
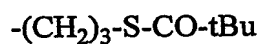
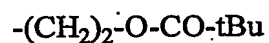
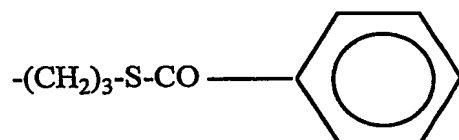
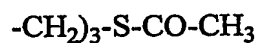
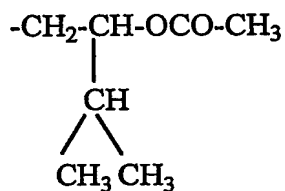
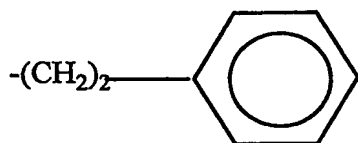
5 - R₅ représente un atome d'hydrogène, un contre-
ion acceptable du point de vue pharmacologique, ou un
groupe capable de former un ester phosphinique
hydrolysable *in vivo* ;
pour la fabrication d'un médicament capable d'inhiber
sélectivement le site C-terminal de l'enzyme de
10 conversion de l'angiotensine I.

Dans cette séquence, le groupe PO₂ peut être
sous forme PO₂⁻ en étant associé à un atome d'hydrogène
ou à un contre-ion acceptable du point de vue
pharmacologique, par exemple K⁺, Na⁺, NH₄⁺ ou tout autre
15 ion métallique ou non métallique acceptable du point de
vue pharmacologique. La nature du contre-ion n'a aucune
importance car dans l'eau les groupements chargés sont
dissociés.

Le groupe PO₂ peut aussi être sous forme
20 d'ester phosphinique hydrolysable *in vivo*. Dans ce cas,
le pseudo-peptide est du type pro-drogue et, après
hydrolyse *in vivo* de l'ester, il génère la forme active
du pseudo-peptide.

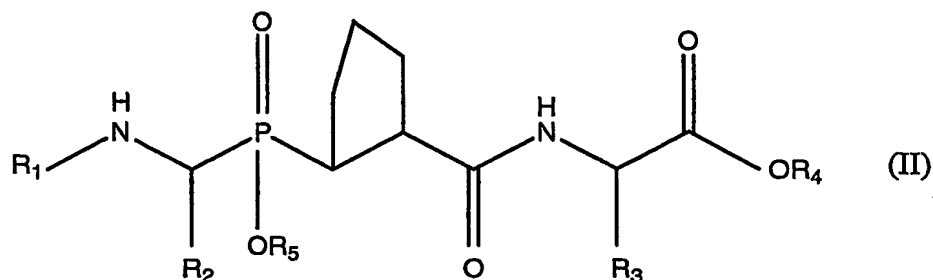
Des groupes de ce type utilisables pour R₅ sont
25 décrits en particulier dans la référence [20].

A titre d'exemples de tels groupes, on peut
citer les groupes répondant aux formules suivantes :



Dans ces formules, t-Bu représente le groupe tert-butyle.

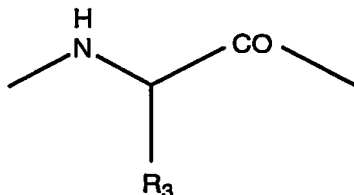
5 Selon un mode particulier de mise en œuvre de l'invention, le dérivé de pseudo-peptide phosphinique répond à la formule (II) suivante :



dans laquelle :

- R_1 représente un groupe protecteur d'une
 5 fonction amine, ou un acide aminé ou un peptide protégé
 par un groupe protecteur d'une fonction amine,

- R_2 et R_3 , qui peuvent être identiques ou
 différents, représentent la chaîne latérale d'un acide
 aminé naturel ou non naturel, l'ensemble :



10

pouvant aussi former le résidu Pro,

- R_4 représente un atome d'hydrogène ou un contre-
 ion acceptable du point de vue pharmacologique, et

15 - R_5 est tel que défini ci-dessus.

Dans les formules données ci-dessus, R_2 et R_3
 représentent la chaîne latérale d'un acide aminé
 naturel ou non naturel, par exemple un pseudo-acide
 aminé.

20 Les acides aminés naturels peuvent être choisis
 parmi l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide
 aspartique, la cystéine, la glutamine, l'acide
 glutamique, la glycine, l'histidine, l'isoleucine, la

leucine, la norleucine, la lysine, la méthionine, la
phénylalanine, la proline, l'hydroxyproline, la sérine,
la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine,
la nitrophénylalanine, l'homoarginine, la thiozolidine
5 et la déshydropoline.

Un pseudo-acide aminé peut être défini comme un
acide aminé dans lequel la fonction amino ou carbonyle
a été remplacée par un autre groupement chimique.

Dans la formule (II) ci-avant mentionnée, le
10 groupe R_1 peut être un groupe protecteur usuel d'une
fonction amine en chimie peptidique. De tels groupes
protecteurs sont bien connus de l'homme du métier et
sont illustrés, par exemple, dans l'ouvrage intitulé
"Protective groups in Organic Synthesis, Second
15 Edition, T.W. Greene et P.G.M. Wuts, John Wiley & Sons,
Inc., pages 309-315 [17]. A titre d'exemples de tels
groupes utilisables dans l'invention, on peut citer les
groupes acétyle et benzyloxycarbonyle.

R_1 peut aussi représenter un acide aminé naturel.
20 ou non naturel ou un peptide dont la fonction amine
terminale est protégée par un groupe protecteur usuel
tel que ceux décrits ci-dessus.

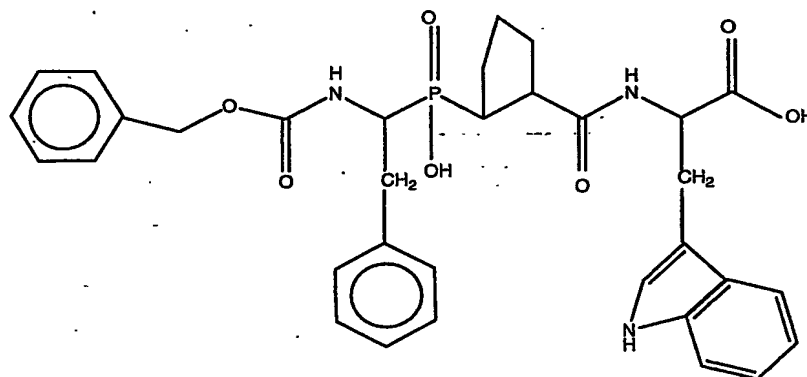
Selon l'invention, comme on le verra ci-après,
la présence du résidu pseudo-proline est essentielle
25 pour obtenir la sélectivité vis-à-vis du site actif C-
terminal de l'ACE, mais la nature des chaînes latérales
présentes en R_2 et R_3 joue aussi un rôle important dans
la sélectivité des interactions des dérivés utilisés
selon l'invention avec les sites N et C-terminaux de
30 l'ACE.

De bons résultats en ce qui concerne l'inhibition du site C-terminal de l'ACE, ont été obtenus avec des pseudo-peptides dans lesquels le groupe R_2 représente le groupe benzyle, méthyle ou phénéthyle, soit la chaîne latérale de la phénylalanine, de l'alanine et de l'homo-phénylalanine.

Pour R_3 , on a obtenu de bons résultats lorsque R_3 représente la chaîne latérale de l'alanine, de l'arginine ou du tryptophane, ou lorsque l'ensemble
10 -NH-CH(R_3)-CO- représente le résidu Pro.

Généralement, R_4 et R_5 représentent un atome d'hydrogène.

Selon un mode préféré de mise en œuvre de l'invention, le dérivé de pseudo-peptide phosphinique
15 répond à la formule suivante :



(pseudo-peptide G)

Les dérivés de pseudo-peptides phosphiniques
20 susceptibles d'être utilisés conformément à l'invention se sont révélés être capables d'inhiber sélectivement le site actif C-terminal de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I et, donc, de contrôler *in vivo* les

taux physiologiques de l'angiotensine II - laquelle joue un rôle central dans le contrôle de la pression artérielle ainsi que de l'homéostasie des fonctions cardiovasculaires chez l'homme - sans interférer pour
5 autant sur le métabolisme de la bradykinine, ni sur celui du peptide Ac-SDKP.

Leur utilisation en tant que principes actifs dans un médicament est donc susceptible de trouver de nombreuses applications dans la prévention et le
10 traitement des pathologies cardiovasculaires humaines, et notamment des pathologies dans lesquelles la bradykinine interviendrait peu comme la prévention de l'athérosclérose.

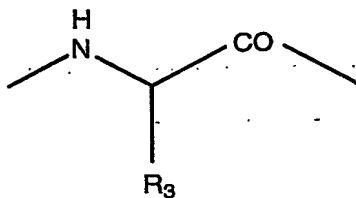
Parmi les dérivés de pseudo-peptides
15 phosphiniques dont l'utilisation est envisagée selon l'invention, il en est qui n'ont jamais été décrits dans la littérature.

Aussi, l'invention a-t-elle également pour objet un dérivé de pseudo-peptide phosphinique
20 comportant la séquence d'acides aminés de formule (I) ci-avant mentionnée, dans laquelle :

- R_2 représente la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel,

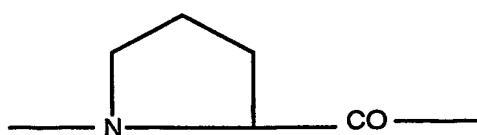
- l'ensemble :

25



forme le résidu Pro :

5



et

- R_5 représente un atome d'hydrogène, un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique, ou un groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo*.

10

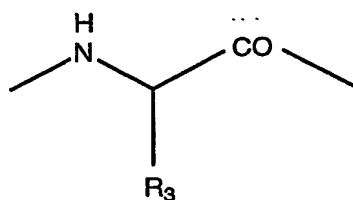
Parmi ces dérivés, on préfère notamment ceux qui répondent à la formule (II) ci-avant mentionnée, dans laquelle :

- R_1 représente un groupe protecteur d'une fonction amine, ou un acide aminé ou un peptide protégé par un groupe protecteur d'une fonction amine,

15

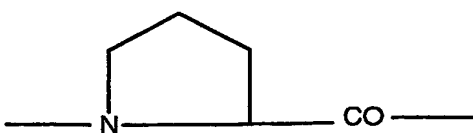
- R_2 représente la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel,

- l'ensemble :



20

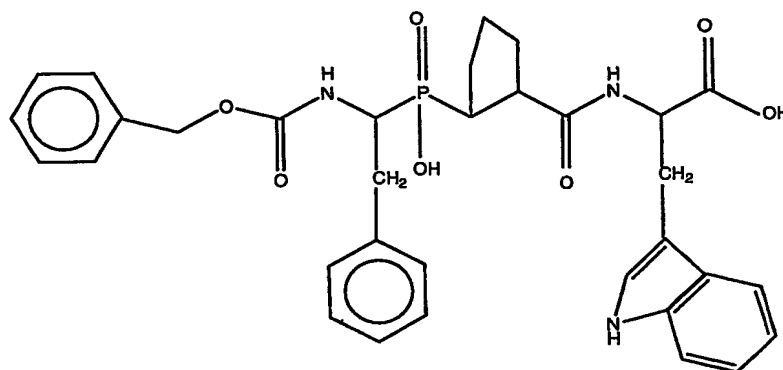
forme le résidu Pro :



- R_4 représente un atome d'hydrogène ou un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique,

- R_5 représente un atome d'hydrogène, un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique, ou un
5 groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo*.

Plus particulièrement, on préfère le dérivé de pseudo-peptide phosphinique de formule :



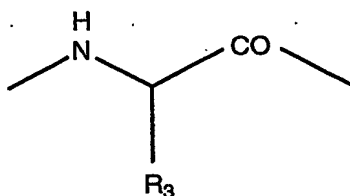
(pseudo-peptide G)

10

L'invention a encore pour objet une composition pharmaceutique qui comprend au moins un dérivé de pseudo-peptide phosphinique répondant à la formule (II)
15 ci-avant mentionnée, dans laquelle :

- R_2 représente la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel,

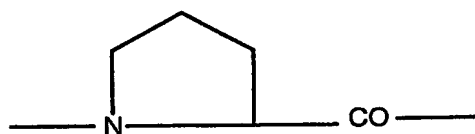
- l'ensemble :



20

forme le résidu Pro :

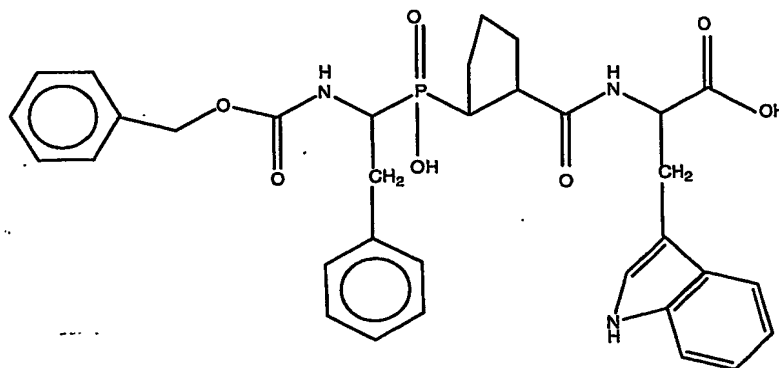
5



et

- R₅ représente un atome d'hydrogène, un contre-
ion acceptable du point de vue pharmacologique, ou un
groupe capable de former un ester phosphinique
10 hydrolysable *in vivo*.

Dans cette composition, le dérivé pseudo-
peptidique phosphinique répond, de préférence, à la
formule :



15

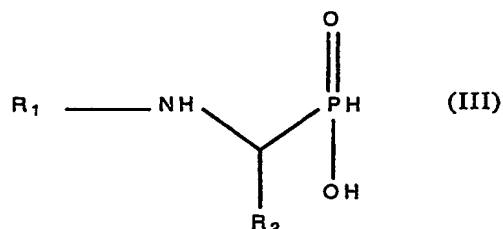
(pseudo-peptide G)

Eu égard à ce qui précède, une telle
composition pharmaceutique est notamment susceptible de
trouver de multiples applications dans la prévention et
20 le traitement de différentes pathologies
cardiovasculaires chez l'homme.

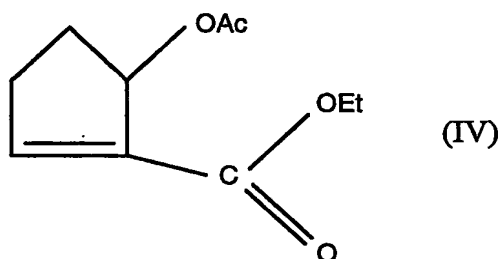
Les dérivés de pseudo-peptides phosphiniques répondant à la formule (II) ci-avant mentionnée, dans laquelle R_4 et R_5 représentent un atome d'hydrogène, peuvent être préparés par un procédé comprenant les

5 étapes suivantes :

1) faire réagir un composé de formule (III) :

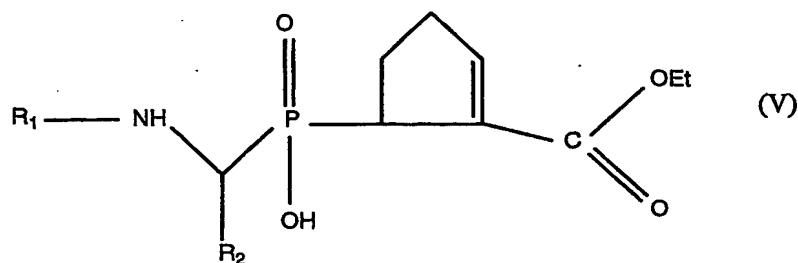


dans laquelle R_1 et R_2 sont tels que définis ci-dessus avec le composé de formule (IV) :



10

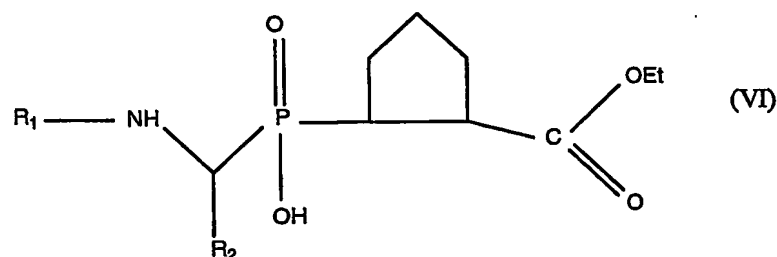
dans laquelle Ac représente le groupe acétyle et Et représente le groupe éthyle, pour obtenir le composé de formule (V) :



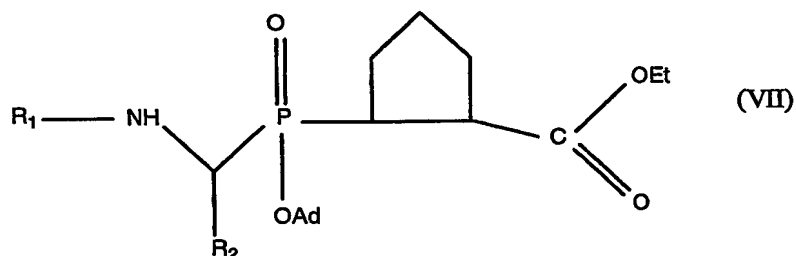
15

2) transformer le composé (V) en composé (VI) par réaction du composé (V) avec du borohydrure de sodium :

17

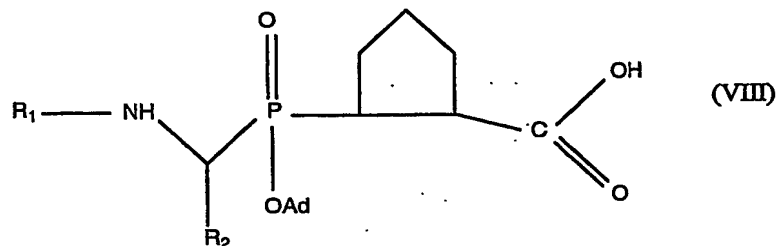


3) protéger le groupe hydroxyle du composé (VI) par un groupe adamantyle Ad pour obtenir le composé de formule (VII) :

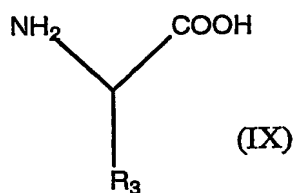


5

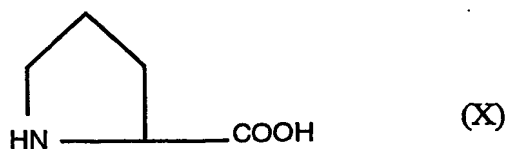
4) saponifier le composé (VII) pour obtenir le composé de formule (VIII) :



5) coupler le composé de formule (VIII) avec l'acide aminé de formule (IX) ou (X) :



ou



dans laquelle R₃ est tel que défini ci-dessus, et

6) éliminer le groupe protecteur Ad.

Selon ce procédé, on synthétise tout d'abord le bloc phosphinique de formule (VIII) comprenant la pseudo-proline, et on effectue ensuite un couplage peptidique de ce bloc phosphinique avec l'acide aminé
5 voulu.

Avantageusement, l'étape 5) de couplage peptidique est réalisée par synthèse peptidique sur phase solide en utilisant comme phase solide une résine substituée par l'acide aminé de formule (IX) ou (X),
10 dont l'extrémité N-terminale aura été préalablement protégée par un groupe Fmoc (fluorényl méthoxy carbonyle).

Si nécessaire, on peut ensuite estérifier ou salifier la fonction phosphinique du pseudo-peptide de
15 formule (II) dans laquelle R_5 représente un atome d'hydrogène, en le faisant réagir avec des réactifs appropriés.

L'estérification peut être obtenue par couplage avec un alcool de formule R_5OH dans laquelle R_5
20 représente un groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo*, en utilisant par exemple le procédé décrit dans la référence [20] (méthode A).

On peut aussi réaliser l'estérification par
25 réaction avec un halogénure de formule R_5X dans laquelle R_5 représente le groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo*. Cette réaction peut être effectuée dans des conditions alcalines en utilisant le procédé décrit dans la référence [20]
30 (méthode B).

Avant d'effectuer cette estérification, on protège la(les) fonction(s) acide(s) carboxylique(s) du pseudo-peptide par des groupes protecteurs appropriés que l'on élimine ensuite en utilisant des techniques
5 classiques.

Lorsqu'on veut salifier la fonction phosphinique du pseudo-peptide de formule (II) dans laquelle R_5 est un atome d'hydrogène, pour remplacer cet atome d'hydrogène par un contre-ion
10 pharmaceutiquement acceptable, on fait réagir le pseudo-peptide avec une base appropriée contenant ce contre-ion, par exemple NaOH, KOH, NH_4OH .

On peut utiliser la même technique pour salifier le groupe carboxylique terminal du pseudo-peptide afin de remplacer l'atome d'hydrogène par un
15 contre-ion pharmaceutiquement acceptable.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront mieux à la lecture du complément de description qui suit, qui se rapporte à des exemples de
20 réalisation de dérivés de pseudo-peptides conformes à l'invention et de démonstration de leurs propriétés, en référence aux dessins annexés.

Bien entendu, ce complément de description est donné à titre illustratif et non limitatif de l'objet
25 de l'invention.

Brève description des dessins

La figure 1 illustre la synthèse de synthons utiles pour la préparation des pseudo-peptides
30 phosphiniques conformes à l'invention.

La figure 2 illustre le chromatogramme obtenu lors de la purification du pseudo-peptide G par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

La figure 3 illustre les effets *in vivo* du pseudo-peptide G sur le clivage de l'angiotensine I en angiotensine II.

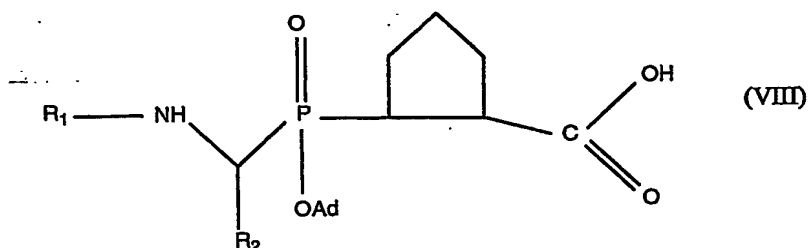
La figure 4 illustre les effets *in vivo* du pseudo-peptide G sur le clivage de la bradykinine.

La figure 5 illustre les effets *in vivo* du pseudo-peptide G et du RPX407 (inhibiteur sélectif du site N-terminal de l'ACE) sur le clivage du peptide Ac-SDKP.

Exposé détaillé des modes de réalisation

La synthèse des pseudo-peptides phosphiniques a été effectuée en suivant le schéma de synthèse décrit sur la figure 1.

Cette figure représente les étapes du procédé aboutissant aux synthons de formule (VIII) :



dans laquelle :

- R₁ représente le groupe benzyloxycarbonyle (Cbz), et
- R₂ est le groupe phényle (composés 1a, 3a, 4a, 5a et 6a), le groupe phénéthyle (composés 1b, 3b, 4b,

5b et 6b) ou le groupe méthyle (composés 1c, 3c, 4c, 5c et 6c).

Exemple 1 :préparation du composé 6a

5 1) Préparation du composé 1a

Ce dérivé d'acide amino-phosphinique est préparé selon la procédure décrite par Baylis [18], puis l'énantiomère de configuration R est obtenu par recristallisation en suivant le protocole rapporté dans
10 Baylis [18].

2) Préparation du composé 2a

Ce composé est obtenu en suivant la procédure publiée par Villieras et al [19]. Le produit obtenu a
15 été caractérisé par RMN :

^1H -RMN (250 MHz, CDCl_3) : 7,03 (t, 1H), 5,93 (m, 1H), 4,1 (m, 2H), 2,6 (m, 1H), 2,34 (m, 2H), 1,95 (s, 3H), 1,82 (m, 1H), 1,18 (t, 3H).

20 3) Préparation du composé 3a

Un mélange du composé 1a (3,2 g, 10 mmol) et d'hexaméthylidisilazane (10,5 mL, 50 mmol) sous flux d'argon est chauffé à 110°C durant 3h. A cette température, le composé 2 (5,5 g, 12 mmol) est ajouté
25 et cette solution est mise sous agitation pour 4h à 90°C. A cette solution refroidie à 70°C, 10 mL d'éthanol EtOH absolu sont ajoutés, goutte à goutte, le mélange étant agité à 70°C pendant 30 min. Après évaporation des solvants, le résidu est solubilisé dans
30 5% NaHCO_3 (10 mL) et 5 mL d'hexane. Après 3 extractions avec de l'acétate d'éthyle AcOEt (3 x 5 mL), le produit

brut est obtenu après évaporation du solvant. Une purification sur colonne de silice, utilisant comme phase mobile un mélange chloroforme/méthanol/acide acétique (7/0,3/0,3) permet d'obtenir 4 g de composé 3a pur, sous forme d'un solide blanc (rendement de 89%).

La caractérisation RMN de ce produit est basée sur des expériences COSY, TOCSY et HMQC :

^1H -RMN (250 MHz, CDCl_3) : 1,27 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,1\text{Hz}$, 3H, CH_2CH_3), 1,95-3,00 (m, 5H, $\text{PCH}(\text{CH}_2)_2$, PhCHH), 3,13-3,45 (m, 2H, PCH , PhCHH), 4,02-4,31 (m, 2H, CH_2CH_3), 4,34-4,63 (m, 1H, PCH), 4,78-5,05 (m, 2H, OCH_2Ph), 5,71 (d, 1H, NH, $^3J_{\text{HH}} = 11,3\text{Hz}$, I), 5,78 (d, 1H, NH, $^3J_{\text{HH}} = 10,8\text{Hz}$, II), 6,91-6,99 (d, 1H, $\text{C}=\text{CH}$, I/II), 7,02-7,34 (m, 10H, aryl).

^{13}C -RMN (62MHz, CDCl_3) : 14,2/14,2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 26,2/26,5 (PCHCH_2), 32,7/32,8 ($\text{PCHCH}_2\text{CH}_2$), 34,5 (CH_2Ph), 41,8 (d, $^1J_{\text{PC}} = 87,7\text{Hz}$, PCHC , I), 43,1 (d, $^1J_{\text{PC}} = 87,3\text{Hz}$, PCHC , II), 50,5 (d, $^1J_{\text{PC}} = 99,7\text{Hz}$, PCHN , I), 50,5 (d, $^1J_{\text{PC}} = 100,5\text{Hz}$, PCHN , II), 61,1/61,2 (CH_2CH_3), 66,8 (OCH_2Ph), 126,6, 127,7, 127,8, 127,9, 127,9, 128,4, 128,4, 129,4, 132,2, 132,3, 132,9, 136,5, 136,6, 137,1, 137,3, (aryles), 148,1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 8,7\text{Hz}$, $=\text{CCO}$, I), 148,1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 9\text{Hz}$, $=\text{CCO}$, II), 156,1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5,5\text{Hz}$, CONH , I), 156,2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5,7\text{Hz}$, CONH , II), 165,3 (d, $^2J_{\text{PC}} = 2,7\text{Hz}$, COOEt).

^{31}P -RMN (100MHz, CDCl_3) : 46,89, 48,13.

Les mentions I et II correspondent aux différents diastéréoisomères.

Analyse élémentaire :

Valeurs théoriques :

C : 61,80%, H : 6,27%, N : 3,00%

Valeurs expérimentales :

C : 61,89%, H : 6,23%, N : 2,98%

4) Préparation du composé 4a

5 Le composé 3a (1,4 g, 3,06 mmol) et du
NiCl₂.6H₂O (1,09 g, 9,2 mmol) sont solubilisés dans un
mélange THF (12,4 mL)/méthanol (7,7 mL). A cette
solution est ajouté par portions du NaBH₄ (0,58 g,
15,4 mmol) pendant 30 min, à -30°C. Ce mélange reste
10 sous agitation pendant 10 min, à -30°C. Les solvants
sont évaporés et le produit est extrait dans un mélange
AcOEt (25 mL) et HCl 1N (20 mL, pH 1).

La phase organique est prélevée et lavée à
l'eau (10 mL), puis séchée avec du Na₂SO₄. Après
15 évaporation des solvants, le produit est purifié sur
colonne de silice avec une phase mobile
chloroforme/méthanol/acide acétique (7/0,3/0,3). On
obtient 1,28 g du composé 4a (rendement de 91%).

L'analyse par spectrométrie de masse mode
20 négatif (masse observée MH⁺ = 458,48, masse attendue =
459,47) est en accord avec la structure chimique du
composé 4a.

Analyse élémentaire :

25 Valeurs théoriques :

C : 61,78%, H : 6,63%, N : 3,00%

Valeurs expérimentales :

C : 61,98%, H : 6,31%, N : 3,08%

5) Préparation du composé 5a

L'adamantylation du composé 4a est réalisée en suivant le protocole décrit par Yiotakis et al [14].

A une solution du composé 4a (1,03 g, 2,24 mmol) dans le chloroforme, 1-Adamantyl-Br (538 mg, 2,5 mmol) et Ag₂O (577 mg), répartis en 5 portions égales, sont ajoutés pendant 1h. Après 2h, 0,5 eq de AdBr et 0,5 eq de Ag₂O ont été rajoutés et le mélange porté au reflux pendant 10h. Après évaporation des solvants, le produit brut est purifié sur colonne de silice en utilisant comme phase mobile un mélange chloroforme/isopropanol (9,8/0,2). Le composé 5a est obtenu sous forme pure avec un rendement de 96% (1,27 g).

Analyse par spectrométrie de masse, mode positif : masse observée MH⁺ = 594,21, masse attendue = 593,1.

Analyse élémentaire :

Valeurs théoriques :

C : 67,76%, H : 7,53%, N : 2,32%

Valeurs expérimentales :

C : 67,49%, H : 7,58%, N : 2,24%

6) Préparation du composé 6a

Après dilution du composé 5a (1,1 g, 1,85 mmol) dans le méthanol (20 mL), 2 mL de NaOH 4N sont ajoutés. Après 6h sous agitation, le suivi de la réaction par TLC confirme la saponification complète du produit de départ. Après évaporation du solvant, le produit est repris dans un mélange eau (10 mL), puis ajout de AcOEt

(15 mL) et acidification à pH 1 avec HCl 1N. Le résidu est repris dans la phase organique et la procédure d'extraction répétée deux fois. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na₂SO₄, puis les solvants évaporés. Le composé pur 6a est obtenu avec un rendement de 94% (0,98 g).

Analyse par spectrométrie de masse, mode positif : masse observée MH⁺ = 566,15, masse attendue = 565,26.

10

Analyse élémentaire :

Valeurs théoriques :

C : 67,95%, H : 7,13%, N : 2,48%

Valeurs expérimentales :

15 C : 67,64%, H : 7,30%, N : 2,40 %

Exemple 2 : Préparation du composé 6b

On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 1 pour préparer le composé 6b en partant du composé 1b qui est préparé selon la procédure décrite dans [18].

20

L'analyse par spectrométrie de masse du composé 6b a donné les résultats suivants : masse attendue = 579,27, masse observée MH⁺ = 580,29.

25

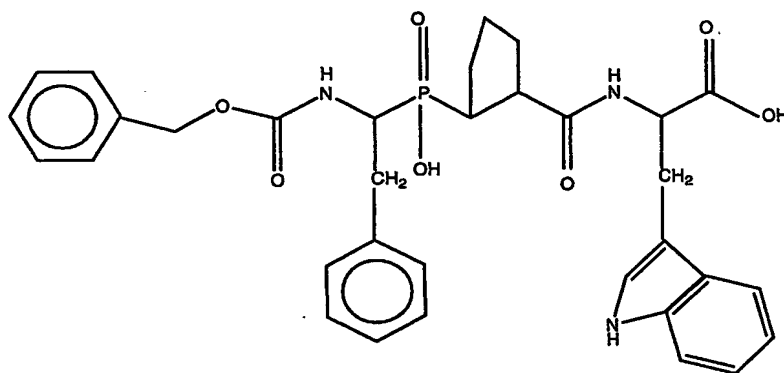
Exemple 3 : préparation du composé 6c

On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 1 pour préparer le composé 6c en partant du composé 1c qui est préparé selon la procédure décrite dans [18].

30

L'analyse par spectrométrie de masse du composé 6c a donné les résultats suivants : masse attendue = 489,23, masse observée MH^+ = 490,11.

5 Exemple 4 : préparation du pseudo-peptide G de formule :



(pseudo-peptide G)

10 Ce pseudo-peptide a été synthétisé sur phase solide en utilisant un protocole standard de synthèse de peptides sur phase solide. La résine Wang substituée par un Fmoc-Trp (732 mg, 0,58 mmol) est suspendue dans la N-méthyl pyrrolidone NMP (5 mL) et agitée pendant
15 5 min. Après élimination de la NMP par filtration, 10 mL de pipéridine à 20% dans NMP sont ajoutés et le mélange est agité pendant 15 min. Après filtration, la résine est lavée avec les solvants suivants : NMP (7x10 mL), CH_2Cl_2 (3x10 mL) et Et_2O (2x10 mL). Sont
20 ajoutés alors dans le réacteur, NMP 2ml, diisopropopyl éthylamine DIEA (749 mg, 5,76 mmol) et le composé 6a (360mg, 0,64 mmol) dilué dans la NMP (2 mL) et 2-(1H)benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate HBTU (730 mg, 1,92 mmol, dilué dans NMP

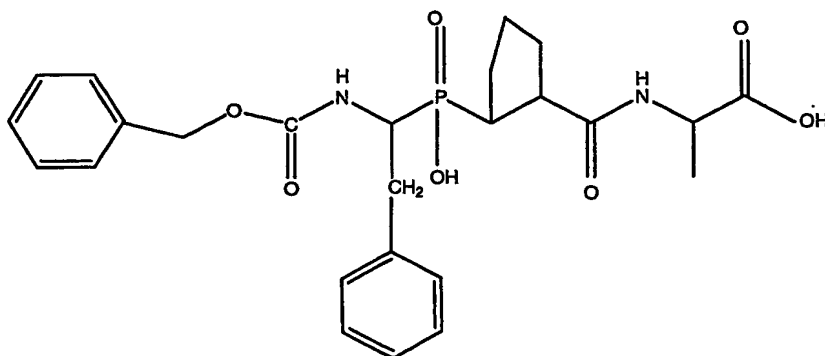
3 mL). Le mélange est laissé sous agitation pendant 24h. Après filtration, la résine est lavée avec la NMP (4x7 mL), CH_2Cl_2 (5x7 mL). Puis, une solution d'acide trifluoroacétique TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O /triisopropylsilane (90/7,5/1,25/1,25) est ajoutée dans le réacteur et le mélange mis sous agitation pendant 3h (phase de déprotection). Après filtration, le filtrat contenant le pseudo-peptide G est récupéré, le solvant est évaporé et le produit est solubilisé dans H_2O . Après lyophilisation, le pseudo-peptide G est purifié par HPLC phase-inverse (colonne Vydac, C18, semi-préparative).

La figure 2 illustre le chromatogramme obtenu. Sur cette figure, on observe 4 pics correspondants aux 4 diastéréoisomères présents dans le pseudo-peptide G (ces quatre pics possèdent un spectre de masse identique, masse observée $\text{MH}^+ = 618,23$, masse attendue = 617,23). Seul le pic 1 montre un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'ACE.

La caractérisation RMN du pseudo-peptide G, pic 1 HPLC, est basée sur des expériences COSY, TOCSY et HMQC :

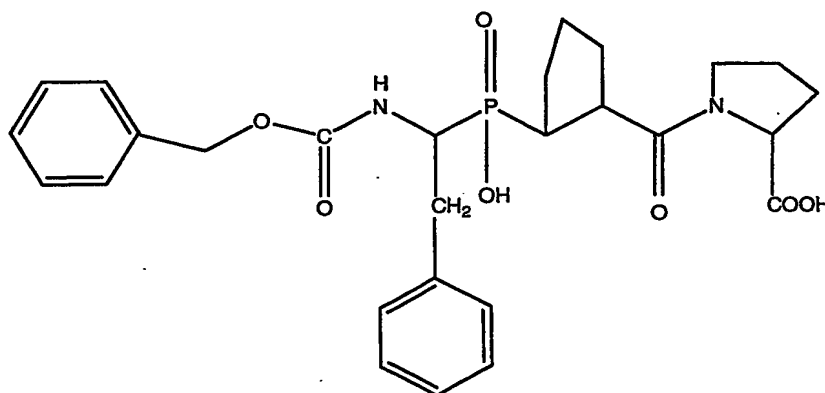
^1H -RMN (250 MHz, DMSO) 4,93 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-Ph}$), 4,01 (m, 1H, $\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$), 2,77 (m, 1H, $\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$), 3,08 (m, 1H, $\text{CH-CH}_2\text{-Ph}$), 3,09 (α -pseudo-Proline), 1,77 (β -pseudo-Proline), 1,56 (γ -pseudo-Proline), 1,79 (δ -pseudo-Proline), 2,49 (ϵ -pseudo-Proline), 4,50 (α -Trp), 3,13 (β , β -Trp), 7,6 NH, 8,3 NH, aryles 7,35-6,9.

Exemples 5 à 7 : préparation des pseudo-peptides B, C et D de formules :

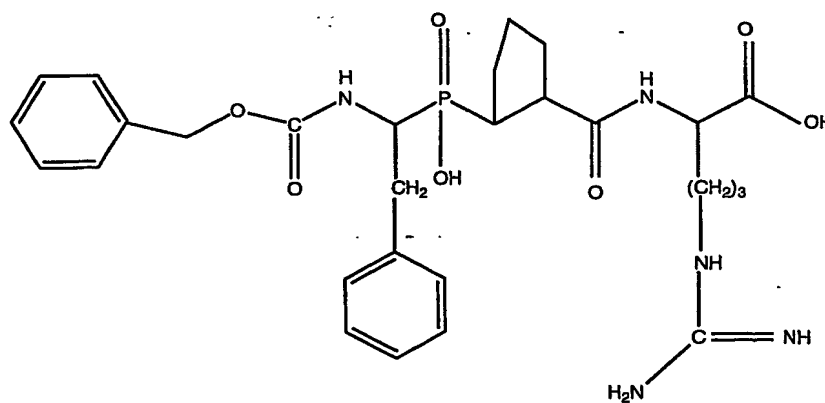


pseudo-peptide B

5



pseudo-peptide C



pseudo-peptide D

Les pseudo-peptides B, C et D ont été synthétisés en phase solide avec des résines Wang substituées par l'alanine (B), la proline (C) et l'arginine (D), en utilisant le protocole décrit pour la préparation du pseudo-peptide G. La purification de ces pseudo-peptides par HPLC a permis d'isoler des diastéréoisomères de ces pseudo-peptides capables d'inhiber l'ACE.

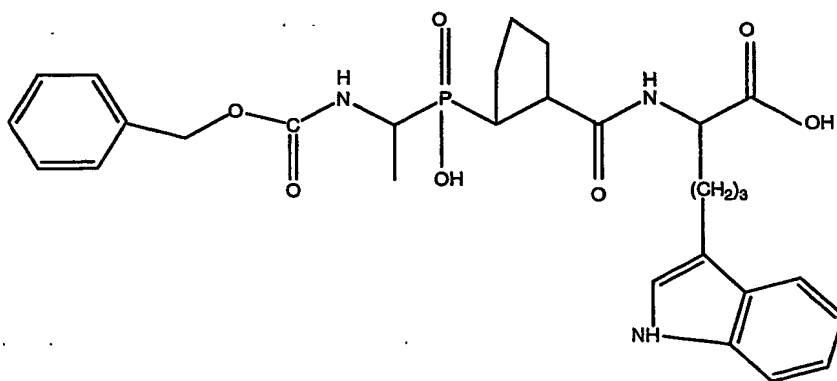
L'analyse des pseudo-peptides par spectrométrie de masse confirme la structure de ces pseudo-peptides.

Pseudo-peptide B : masse attendue 502,19 ; masse observée 503,21.

Pseudo-peptide C : masse attendue 528,53 ; masse observée 529,11.

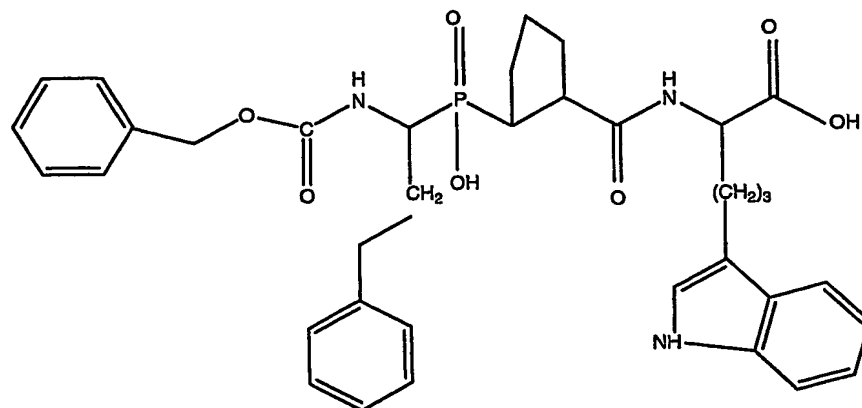
Pseudo-peptide D : masse attendue 587,25 ; masse observée 587,24.

Exemples 8 et 9 : préparation des pseudo-peptides E et F de formules :



pseudo-peptide E

30



pseudo-peptide F

On obtient les pseudo-peptides E et F par
synthèse en phase solide, en partant des composés 6b et
5 6c et en suivant le protocole décrit pour la
préparation du pseudo-peptide G. Après purification par
HPLC C18 mode inverse, la première fraction collectée
pour chacun de ces pseudo-peptides s'est avérée capable
d'inhiber l'ACE.

10 L'analyse par spectrométrie de masse a donné
les résultats suivants :

Pseudo-peptide E : masse attendue 541,20 ; masse
observée 542,26.

15 Pseudo-peptide F : masse attendue 631,24 ; masse
observée 632,26.

**Exemple 10 : détermination des constantes d'inhibition
des pseudo-peptides A à G vis-à-vis des sites N et C
terminaux de l'ACE**

20 Pour cette détermination, on utilise de l'ACE
recombinante humaine. Des courbes d'inhibition de l'ACE
par les pseudo-peptides A à G sont obtenues en
utilisant le substrat à fluorescence quenchée Mca-Ala :

Mca-Ala-Ser-Asp-Lys-DpaOH (Mca : acide 7-méthoxy-coumarine-2-acétique ; DpaOH : N-3(2,4-dinitrophényl)L-2,3-diaminopropionyle).

Pour ces essais, on utilise la première
5 fraction collectée lors de la purification de chacun des pseudo-peptides A à G par HPLC (pic 1 de la figure 2 pour le pseudo-peptide G).

A partir des profils d'inhibition obtenus avec ce substrat, pour chaque pseudo-peptide A à G, il est
10 possible de déterminer les constantes K_i N et K_i C en suivant la procédure décrite dans Dive et al [8].

Les expériences d'inhibition ont été réalisées à 25°C, pH 6,8, 50 mM HEPES, 10 mM CaCl_2 , 200 mM NaCl.

Les résultats obtenus sont donnés dans le
15 tableau 1 annexé.

A titre comparatif, on a effectué le même essai avec le pseudo-peptide A ne comportant pas de résidu pseudo-proline. Les résultats obtenus sont également donnés dans le tableau 1. Ce pseudo-peptide a été
20 préparé à partir du bloc phosphinique ZPhe[PO(OAd)- CH_2]AlaOH, décrit dans Yiotakis et al. [14], puis couplage de ce bloc à une résine Wang substituée par le résidu Fmoc-Ala.

L'étude des effets inhibiteurs des pseudo-peptides A à G sur l'ACE et la comparaison de leur
25 affinité vis-à-vis du site N-terminal (K_i N) et du site C-terminal (K_i C) de l'ACE (tableau 1) permettent de tirer les conclusions suivantes.

30 1°) Pseudo-peptides A et B : pour ce qui concerne l'affinité vis-à-vis des deux sites actifs de l'ACE, la

présence d'un résidu pseudo-proline apparaît bien moins favorable qu'un résidu pseudo-alanine. En revanche, la présence d'un résidu pseudo-proline en position P1' de ces pseudo-peptides phosphiniques donne accès à des inhibiteurs sélectifs du site C-terminal de l'ACE. Ce résultat démontre le rôle essentiel du résidu pseudo-proline pour contrôler la sélectivité des inhibiteurs vis-à-vis du site C-terminal de l'ACE.

2°) Pseudo-peptides B, C, D et G : Les modifications de la position P2' avec les résidus alanine, proline, arginine et tryptophane démontrent que la nature de la chaîne latérale dans cette position est aussi un facteur essentiel de la sélectivité. La présence du résidu proline (pseudo-peptide C) génère un inhibiteur puissant, mais peu sélectif des sites N et C de l'ACE. Par contre, la présence d'un résidu tryptophane permet d'obtenir un inhibiteur (pseudo-peptide G) extrêmement sélectif du site C-terminal de l'ACE.

3°) Pseudo-peptides E et F : La substitution d'un résidu pseudo-phénylalanine dans la position P1 des pseudo-peptides, par un résidu pseudo-alanine ou pseudo-homophénylalanine conduit à des pseudo-peptides moins puissants et moins sélectifs que le pseudo-peptide G. Ce dernier résultat démontre une importance moindre de la position P1 des inhibiteurs vis-à-vis de la sélectivité.

L'étude des pseudo-peptides A à G permet de conclure que, dans les pseudo-peptides de l'invention, chaque position P1, P1' et P2' contribue à la

sélectivité des interactions. La présence dans le pseudo-peptide G des résidus pseudo-phénylalanine, pseudo-proline et tryptophane lui confère une sélectivité particulièrement prononcée.

5

Exemple 11 : mise en évidence des propriétés *in vivo* du pseudo-peptide G

Une étude est réalisée *in vivo* en vue de vérifier l'aptitude du pseudo-peptide G à inhiber la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, et d'apprécier ses effets sur le clivage de la bradykinine d'une part, et du peptide Ac-SDKP d'autre part.

1) Protocole de l'étude

15 Cette étude est réalisée sur des lots de souris mâles C57BL6/J (Iffa Credo) pesant de 20 à 23 g chacune, chaque lot comprenant 6 souris.

Pour ce faire, les souris sont anesthésiées par une administration intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (Sanofi) à la dose de 80 mg/kg de poids corporel. La carotide droite est isolée et un cathéter (PE10, 0,28x0,61, A-M Systems, Inc.) est mis en place dans cette artère pour permettre le prélèvement des échantillons sanguins, tandis qu'un autre cathéter (FEP, 0,12x0,67, Carnegie Medecin) est mis en place dans la jugulaire ipsilatérale pour permettre l'administration des substances. Pendant toute la durée de l'expérimentation, la température corporelle des souris est maintenue à 38°C.

30 Dans un premier temps, on administre aux souris d'un même lot, par perfusion de 30 min :

- soit 50 μ L d'une solution isotonique (ajustée à pH 7) contenant une quantité de pseudo-peptide G correspondant à une dose de 0,9, 3, 10 ou 30 mg/kg de poids corporel,

5 - soit 50 μ L de sérum physiologique,

- soit encore 50 μ L d'une solution contenant une quantité de perindopril correspondant à une dose de 10 mg/kg de poids corporel, cette substance étant un puissant inhibiteur mixte de l'ACE (Servier).

10 Puis, on leur administre en bolus :

- soit un mélange comprenant 2 μ g d'angiotensine I non marquée et 21 μ Ci de 3 H-angiotensine I dans 50 μ L de solution isotonique,

15 - soit un mélange comprenant 2 μ g d'Ac-SDKP non marqué et 17 μ Ci de 3 H-Ac-SDKP dans 50 μ L de solution isotonique,

- soit un mélange comprenant 2 μ g de bradykinine non marquée et 11 μ Ci de 3 H-bradykinine dans 50 μ L de solution isotonique..

20 Des prélèvements de sang artériel, d'environ 50 μ L, sont réalisés 30, 60 et 90 sec après l'injection du mélange d'angiotensine I ou du mélange de bradykinine chez les souris ayant reçu l'un de ces mélanges, et 1, 5, 10 et 15 min après le début de
25 l'injection du mélange d'Ac-SDKP chez les souris ayant reçu ce dernier mélange. Dans tous les cas, le sang est recueilli dans des tubes en propylène préalablement pesés et contenant 40 μ L d'eau, 10 μ L de TFA à 80% et 1 μ L d'héparine. Les quantités exactes de sang prélevé
30 sont déterminées en repesant les tubes. Après addition

de 195 µL d'eau distillée, ces tubes sont placés pendant 10 min dans un bain de glace et les échantillons sont centrifugés à 4°C pour obtenir des extraits plasmatiques.

5 L'analyse de ces extraits est réalisée par chromatographie liquide au moyen d'un système HPLC (PerkinElmer 200) lié à un détecteur de radioéléments (Z 500-4 cell, Berthold). Les séparations chromatographiques sont réalisées sur une colonne
10 Kromasil C18 (AIT), par injection d'échantillons de 50 µL et en utilisant les phases mobiles et les gradients d'élution suivants :

• analyse de l'angiotensine I :

phase mobile :

15 solvant A : CH₃CN/H₂O/TFA (10/90/0,1)

solvant B : CH₃CN/H₂O/TFA (90/10/0,1)

gradients d'élution :

0-30 min : 0-30% B

30-35 min : 30-100% B

20 • analyse de la bradykinine :

phase mobile :

solvant A : CH₃CN/H₂O/TFA (10/90/0,1)

solvant B : CH₃CN/H₂O/TFA (90/10/0,1)

gradients d'élution :

25 0-30 min : 0-25% B

30-35 min : 25-100% B

• analyse de l'Ac-SDKP :

phase mobile :

solvant A : H₂O/TFA (100/0,1)

30 solvant B : CH₃CN/H₂O/TFA (90/10/0,1)

gradients d'élution :

0-30 min : 0-30% B

30-35 min : 30-100% B

Les pics élués sont identifiés par comparaison
5 de leurs temps de rétention à ceux présentés par les
susbtrats non marqués (angiotensine I, bradykinine et
Ac-SDKP) et par les produits de clivage attendus
(angiotensine II, BK(1-7) et BK(1-5)).

Les dosages sont réalisés par intégration de
10 l'aire sous les pics correspondants du chromatogramme.
Les valeurs ainsi obtenues sont normalisées en fonction
du poids de sang prélevé chez chaque souris.

Les comparaisons statistiques des résultats
sont réalisées par le test U non paramétrique de Mann-
15 Whitney (Logiciel Statview 5).

2) Résultats

La figure 3 illustre, sous forme d'un diagramme
à barres, les valeurs moyennes \pm SD du rapport
20 angiotensine II/angiotensine I obtenues chez les souris
ayant reçu 0,9, 3, 10 et 30 mg de pseudo-peptide G par
kg de poids corporel (barres respectivement 0,9, 3, 10
et 30) ainsi que la valeur moyenne \pm SD obtenue pour ce
même rapport chez les souris témoins (barre T), c'est-
25 à-dire les souris ayant reçu 50 μ l de sérum
physiologique. Sur cette figure, * correspond à $p < 0,05$,
tandis que ** correspond à $p < 0,01$, par comparaison aux
souris témoins.

La figure 3 met en évidence le fait que le
30 pseudo-peptide G est apte à inhiber *in vivo* le clivage
de l'angiotensine I en angiotensine II et que cette

inhibition est dose-dépendante. Ainsi, le rapport angiotensine II/angiotensine I mesuré chez les souris témoins est réduit de 50% chez les souris traitées par 0,9 mg de pseudo-peptide G par kg de poids corporel, et de 90% chez les souris traitées par 30 mg de pseudo-peptide G par kg de poids corporel.

La figure 4 illustre, sous forme d'un diagramme à barres, les pourcentages moyens \pm SD de protection de la bradykinine obtenus chez les souris ayant reçu 10 mg de pseudo-peptide G par kg de poids corporel (barre G) et chez les souris témoins (barre T), c'est-à-dire, dans ce cas, les souris ayant reçu 10 mg de périndopril par kg de poids corporel. Sur cette figure, ** correspond à $p < 0,01$ par comparaison aux souris témoins.

Comme visible sur la figure 4, le taux de protection moyen de la bradykinine par le périndopril ayant été arbitrairement fixé à 100%, ce taux de protection n'est plus que de 9,2% chez les souris ayant reçu 10 mg de pseudo-peptide G par kg de poids corporel. Ce pseudo-peptide apparaît donc n'empêcher que très modérément le clivage de la bradykinine *in vivo*.

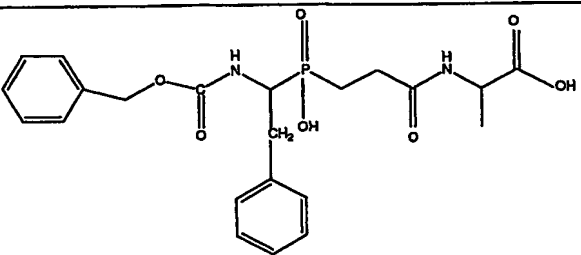
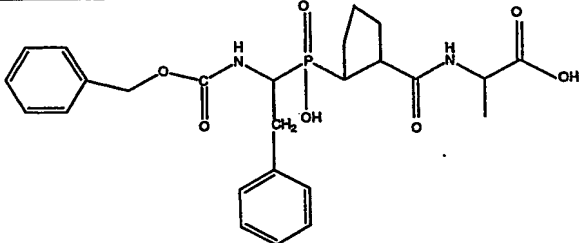
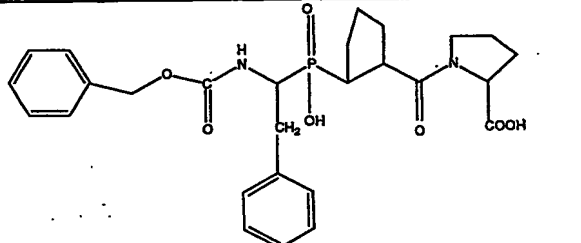
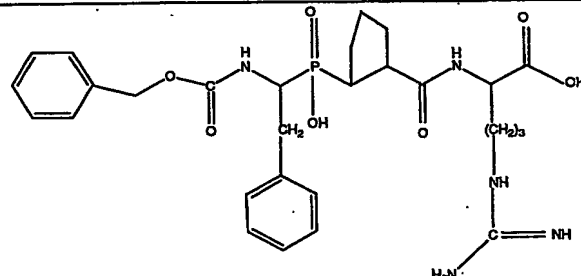
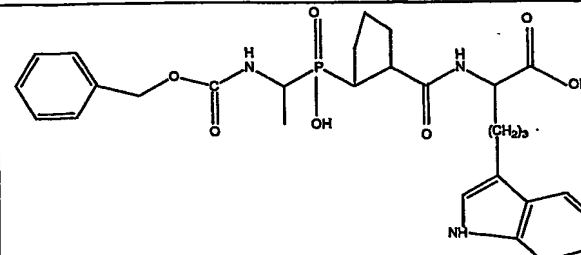
La figure 5 illustre, également sous la forme d'un diagramme à barres, les concentrations sanguines moyennes \pm SD (exprimées en pmol/g de sang) en peptide Ac-SDKP exogène marqué obtenues chez les souris ayant reçu 10 mg de pseudo-peptide G par kg de poids corporel (barre G) et chez les souris témoins (barre T), c'est-à-dire les souris ayant reçu 50 μ l de sérum physiologique. Sur cette figure, ** correspond à $p < 0,01$ par comparaison aux souris témoins.

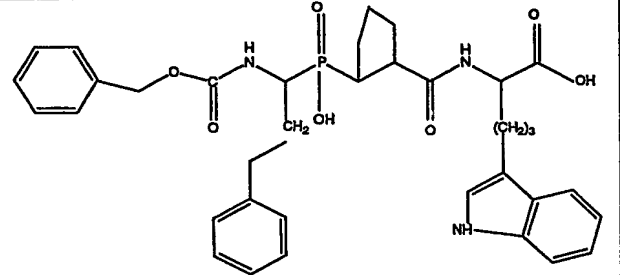
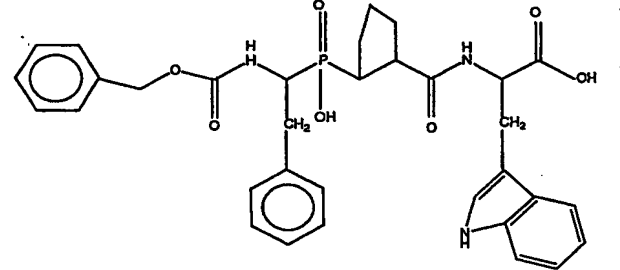
A titre comparatif, le figure 5 montre également la concentration sanguine moyenne \pm SD en peptide Ac-SDKP exogène marqué observée chez des souris traitées par 10 mg du pseudo-peptide RXP407 (décrit
5 comme un inhibiteur sélectif du site N-terminal de l'ACE dans les références [7] et [8]) par kg de poids corporel (barre R) et en suivant un protocole opératoire identique.

Comme le montre la figure 5, le pseudo-peptide
10 G, à la dose de 10 mg/kg de poids corporel, apparaît ne pas avoir d'effet significatif sur le clivage du peptide Ac-SDKP, alors que le RXP407 augmente le taux plasmatique de ce peptide de 16 fois par rapport à celui observé chez les souris témoins.

15 Ainsi, *in vivo*, le pseudo-peptide G inhibe très efficacement la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, sans véritablement empêcher la dégradation de la bradykinine, et encore moins celle du peptide Ac-SDKP.

Tableau 1

Formules	Pseudo-peptide	Ki N nM (10^{-9} M)	Ki C nM (10^{-9} M)
	A	0,8	0,8
	B	450	20
	C	60	4
	D	200	9
	E	8000	60

	F	8000	60
	G	10000	3

Références

- [1] Dzan V.J., 2001, *Hypertension* 37, 1047-1052.
- [2] Linz W., Wiemer G., Gohlke P., Unger T., and
5 Scholkens B.A., 1995, *Pharmacol. Rev.* 47(1), 25-49.
- [3] Soubrier F., Alhenc-Gelas F., Hubert C., Allegrini J., John M., Tregear G., and Corvol P., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(24), 9386-90.
- 10 [4] Wei L., Alhenc-Gelas F., Corvol P., and Clauser E., 1991, *J. Biol. Chem.* 266(14), 9002-8.
- [5] Jaspard E., Wei L., and Alhenc-Gelas F. (1993) *J. Biol. Chem.* 268(13), 9496-503.
- [6] Azizi M., Rousseau A., Ezan E., Guyene T.T.,
15 Michelet S., Grognet J.M., Lenfant M., Corvol P., and Menard J., 1996, *J. Clin. Invest.* 97(3), 839-44.
- [7] WO-A-00/01706
- [8] Dive V., Cotton J., Yiotakis A., Michaud A.,
20 Vassiliou S., Jiracek J., Vazeux G., Chauvet M.T., Cuniasse P., and Corvol P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(8), 4330-5.
- [9] Junot C., Gonzales M.F., Ezan E., Cotton J., Vazeux G., Michaud A., Azizi M., Vassiliou S.,
25 Yiotakis A., Corvol P., and Dive V., 2001, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297(2), 606-11.
- [10] FR-A-2 676 059
- [11] EP-A-0 725 075
- [12] Jiracek J., Yiotakis A., Vincent B., Lecoq A.,
30 Nicolaou A., Checler F., and Dive V., Development

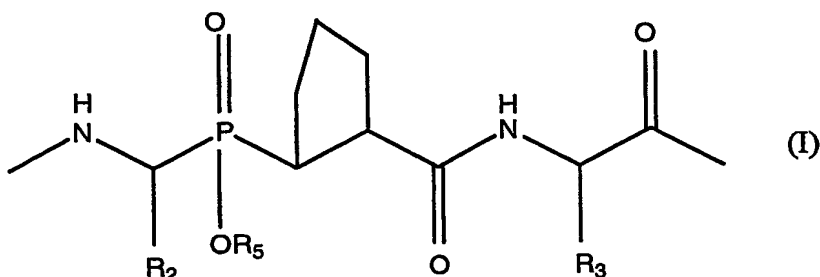
of highly potent and selective phosphinic peptide inhibitors of zinc endopeptidase 24-15 using combinatorial chemistry., 1995, *J. Biol. Chem.* 270(37): 21701-6.

- 5 [13] Jiracek J., Yiotakis A., Vincent B., Checlet F. and Dive V., Development of the first potent and selective inhibitor of the zinc endopeptidase neurolysin using a systematic approach based on combinatorial chemistry of phosphinic peptides,
10 1996, *J. Biol. Chem.* 271(32): 19606-11.
- [14] Yiotakis A., Vassiliou S., Jiracek J., and Dive V., Protection of the hydroxy-phosphinyl function of phosphinic dipeptides by adamantyl. Application to the solid-phase synthesis of phosphinic
15 peptides, 1996, *J. Org. Chem.* 61 : 6601-6605.
- [15] Vassiliou S., Mucha A., Cuniasse P., Georgiadis D., Lucet-Levannier K., Beau F., Kannan R., Murphy G., Knauper V., Rio MC., Basset P., Yiotakis A., and Dive V., Phosphinic pseudo-
20 tripeptides as potent inhibitors of matrix metalloproteinases : a structure-activity study, 1999, *J. Med. Chem.* 42(14): 2610-20.
- [16] Georgiadis D., Vazeux G., Llorens-Cortes C., Yiotakis A., and Dive V., Potent and selective
25 inhibition of zinc aminopeptidase A (EC 3.4.11.7, APA) by glutamyl aminophosphinic peptides : importance of glutamyl aminophosphinic residue in the P1 position, 2000, *Biochemistry* 39(5): 1152-5.

- [17] Protective groups in Organic Synthesis, Second Edition, T.W. Green et P.G.M. Wuts, John Wiley & Sons, Inc., 309-315.
- [18] Baylis E.K., Campbell C.D., and Dingwall J.G., 1984, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I*, 2845.
- [19] Villieras J., Rambaud W.H., and Graff M., 1986, *Synth. Commun.* 16, 149.
- [20] Chen H., Noble F., Roques P., and Fournie-Zaluski M.C., 2001, *J. Med. Chem.* 44, 3523-3530.

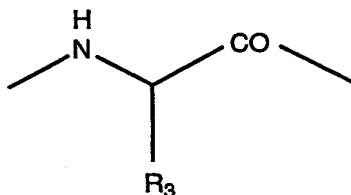
REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un dérivé de pseudo-peptide phosphinique comportant la séquence d'acides aminés de formule (I) suivante :



dans laquelle :

10 - R_2 et R_3 , qui sont identiques ou différents, représentent la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, l'ensemble :

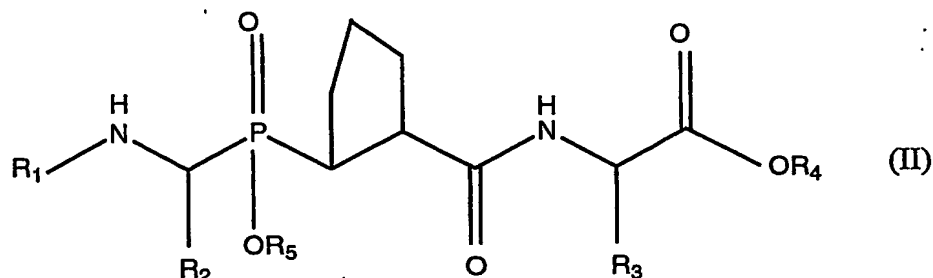


15 pouvant aussi former le résidu Pro, et

- R_5 représente un atome d'hydrogène, un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique, ou un groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo* ;

20 pour la fabrication d'un médicament inhibant sélectivement le site C-terminal de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I.

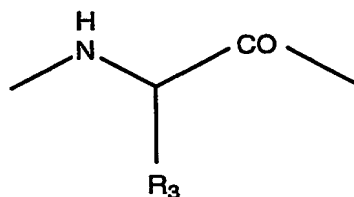
2. Utilisation d'un dérivé de pseudo-peptide phosphinique répondant à la formule (II) suivante :



5

dans laquelle :

- R₁ représente un groupe protecteur d'une fonction amine, ou un acide aminé ou un peptide protégé par un groupe protecteur d'une fonction amine,
- 10 - R₂ et R₃, qui peuvent être identiques ou différents, représentent la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, l'ensemble :



15 pouvant aussi former le résidu Pro,

- R₄ représente un atome d'hydrogène ou un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique, et
- R₅ représente un atome d'hydrogène, un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique, ou un
- 20 groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo* ;

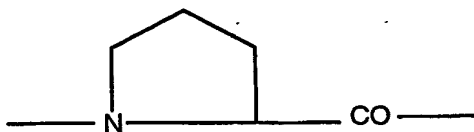
pour la fabrication d'un médicament inhibant sélectivement le site C-terminal de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I.

5 3. Utilisation selon la revendication 2, dans laquelle R_1 représente un groupe protecteur d'une fonction amine choisi parmi les groupes acétyle et benzyloxycarbonyle.

10 4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle R_2 représente le groupe benzyle, méthyle ou phénéthyle.

15 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle R_3 représente la chaîne latérale de l'alanine, de l'arginine ou du tryptophane.

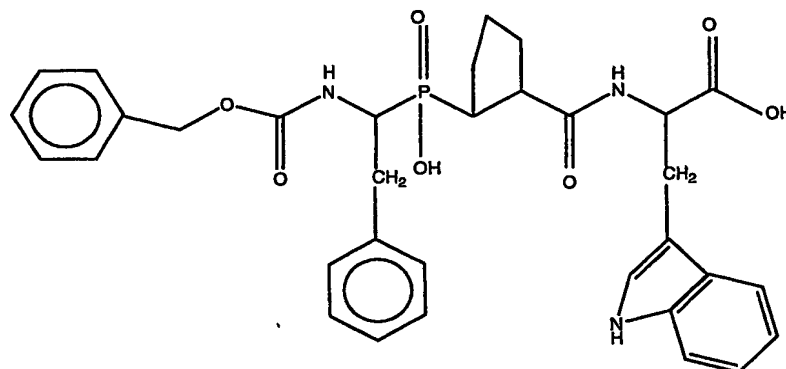
20 6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle l'ensemble $-NH-CH(R_3)-CO-$ forme le résidu Pro :



25 7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans laquelle R_4 et/ou R_5 représentent un atome d'hydrogène.

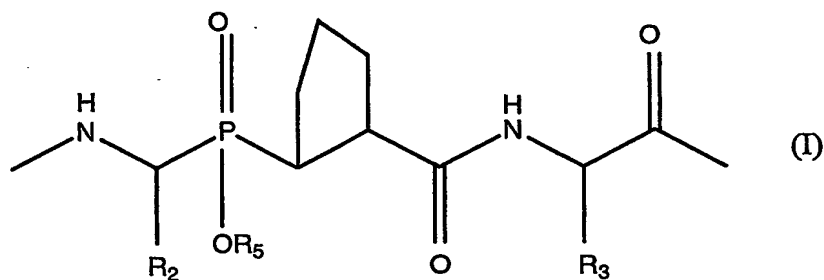
47

8. Utilisation selon la revendication 2, dans laquelle le dérivé de pseudo-peptide phosphinique répond à la formule :



(pseudo-peptide G)

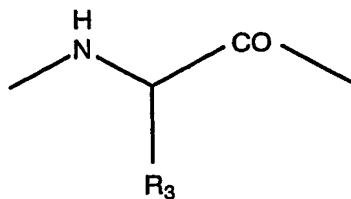
9. Dérivé de pseudo-peptide phosphinique comportant la séquence d'acides aminés de formule (I) suivante :



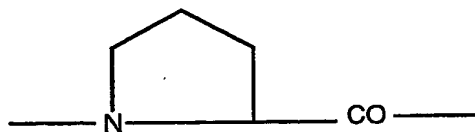
dans laquelle :

- R_2 représente la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel,
- l'ensemble :

48



forme le résidu Pro :

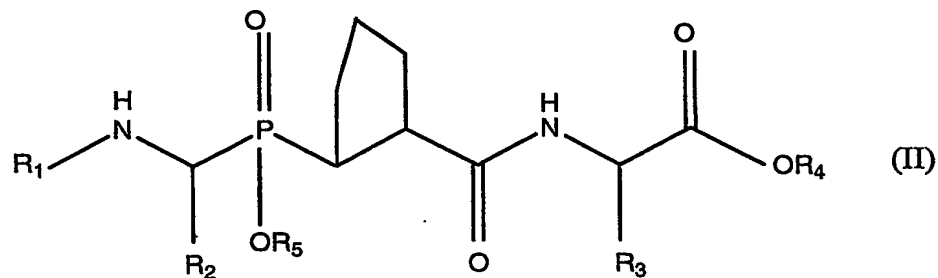


5

- R_4 représente un atome d'hydrogène ou un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique,

- R_5 représente un atome d'hydrogène, un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique, ou un groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo*.

10. Dérivé de pseudo-peptide phosphinique
répondant à la formule (II) suivante :

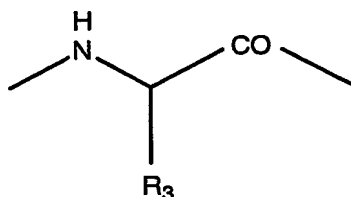


dans laquelle :

- R_1 représente un groupe protecteur d'une fonction amine, ou un acide aminé ou un peptide protégé par un groupe protecteur d'une fonction amine,

- R_2 représente la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel,

- l'ensemble :



forme le résidu Pro :



10

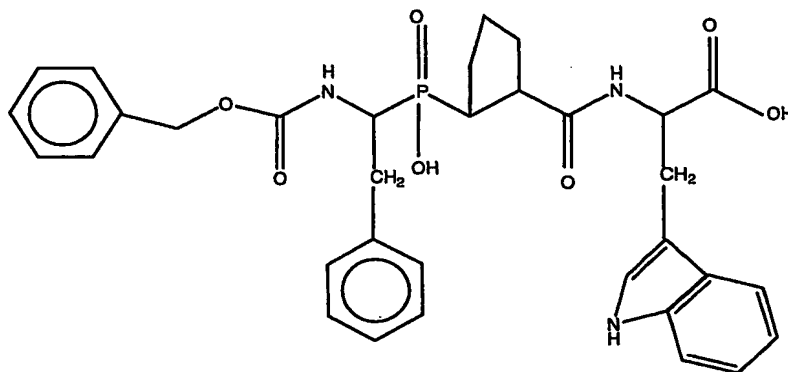
- R_3 représente un atome d'hydrogène, un contre-ion acceptable du point de vue pharmacologique, ou un groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo*.

20

25

50

11. Dérivé de pseudo-peptide phosphinique de formule :

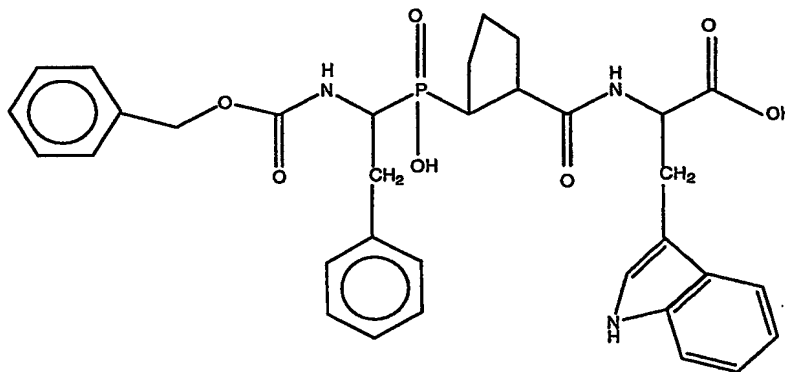


(pseudo-peptide G)

5

12. Composition pharmaceutique comprenant au moins un dérivé de pseudo-peptide phosphinique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11.

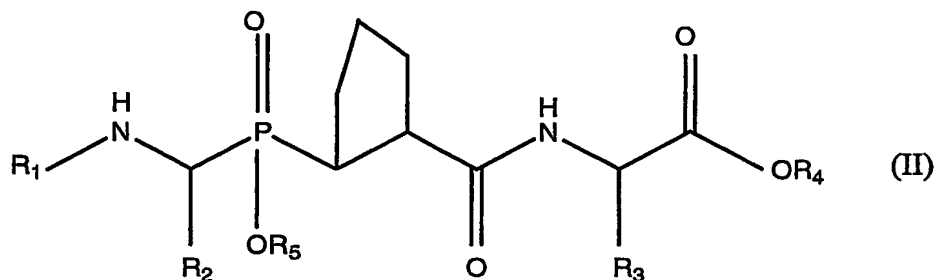
10 13. Composition pharmaceutique, dans laquelle le dérivé pseudo-peptidique phosphinique répond à la formule :



(pseudo-peptide G)

15

14. Procédé de préparation d'un pseudo-peptide de formule :

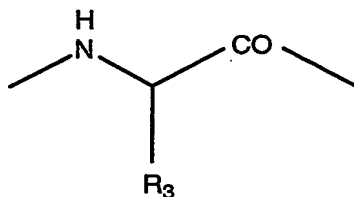


5

dans laquelle :

- R₁ représente un groupe protecteur d'une fonction amine, ou un acide aminé ou un peptide protégé par un groupe protecteur d'une fonction amine,

10 - R₂ et R₃, qui peuvent être identiques ou différents, représentent la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, l'ensemble :

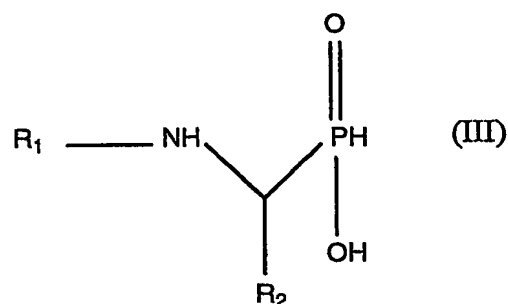


15 pouvant aussi former le résidu Pro, et

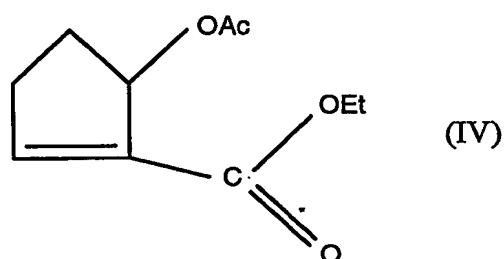
- R₄ et R₅ représentent un atome d'hydrogène ;
qui comprend les étapes suivantes :

1) faire réagir un composé de formule (III):

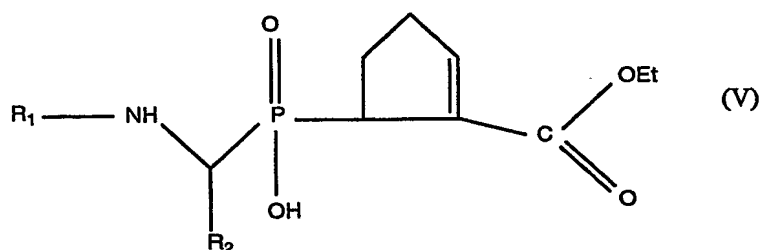
52



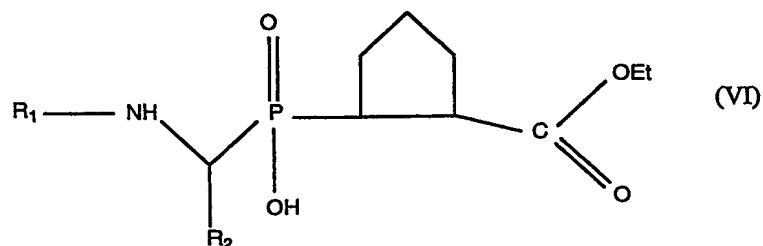
dans laquelle R_1 et R_2 sont tels que définis ci-dessus, avec le composé de formule (IV) :



5 dans laquelle AC représente le groupe acétyle et Et représente le groupe éthyle, pour obtenir le composé de formule (V) :

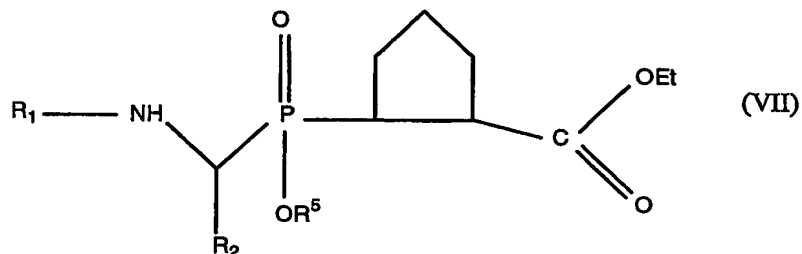


2) transformer le composé (V) en composé (VI) par
10 réaction du composé (V) avec du borohydrure de sodium :

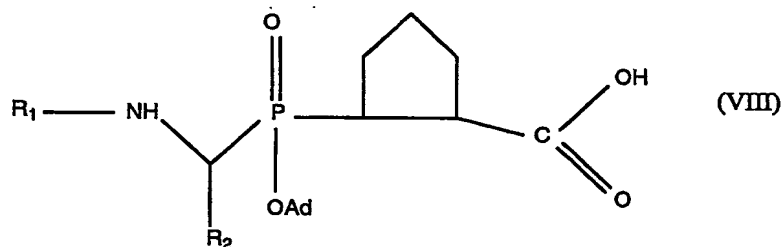


3) protéger le groupe hydroxyle du composé (VI) par un groupe protecteur R_5 , par exemple le groupe

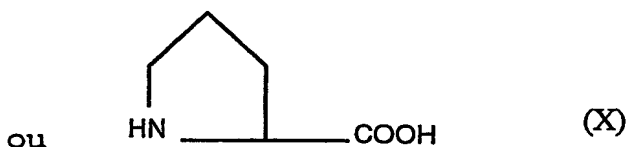
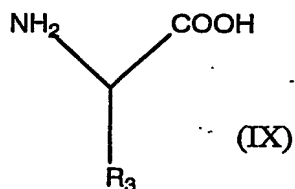
adamantyle Ad, pour obtenir le composé de formule (VII) :



4) saponifier le composé (VII) pour obtenir le
5 composé de formule (VIII) :



5) coupler le composé de formule (VIII) avec
l'acide aminé de formule (IX) ou (X) :



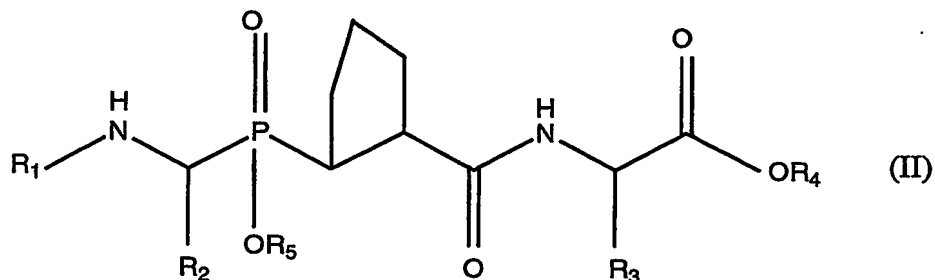
10

dans laquelle R₃ est tel que défini ci-dessus, et

6) éliminer le groupe protecteur Ad.

15 15. Procédé selon la revendication 14, dans lequel
l'étape 5) de couplage peptidique est réalisée par
synthèse peptidique sur phase solide en utilisant comme
phase solide une résine substituée par l'acide aminé de
formule (IX) ou (X).

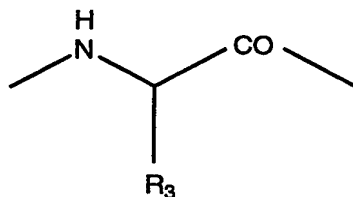
16. Procédé de préparation d'un pseudo-peptide de formule :



5

dans laquelle :

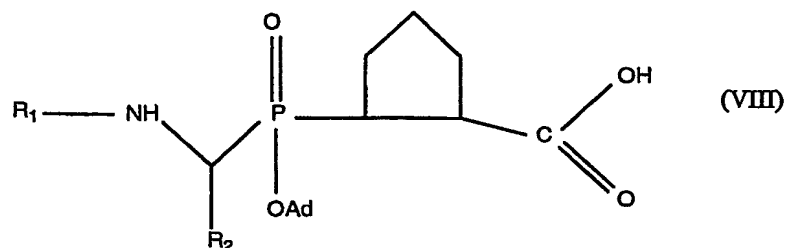
- R_1 représente un groupe protecteur d'une fonction amine, ou un acide aminé ou un peptide protégé par un groupe protecteur d'une fonction amine,
- 10 - R_2 et R_3 , qui peuvent être identiques ou différents, représentent la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel, l'ensemble :



15 pouvant aussi former le résidu Pro,

- R_4 représente un atome d'hydrogène, et
 - R_5 représente un groupe capable de former un ester phosphinique hydrolysable *in vivo* ;
- dans lequel on estérifie la fonction phosphinique du
- 20 pseudo-peptide obtenu par le procédé de la revendication 14 ou 15, par couplage avec un alcool de formule R_5OH ou par réaction avec un halogénure de formule R_5X où X représente un atome d'halogène.

17. Composé de formule (VIII) :



5

dans laquelle :

- R₁ représente un groupe protecteur d'une fonction amine ou un acide aminé ou un peptide protégé par un groupe protecteur d'une fonction amine, et
- 10 - R₂ représente la chaîne latérale d'un acide aminé naturel ou non naturel.

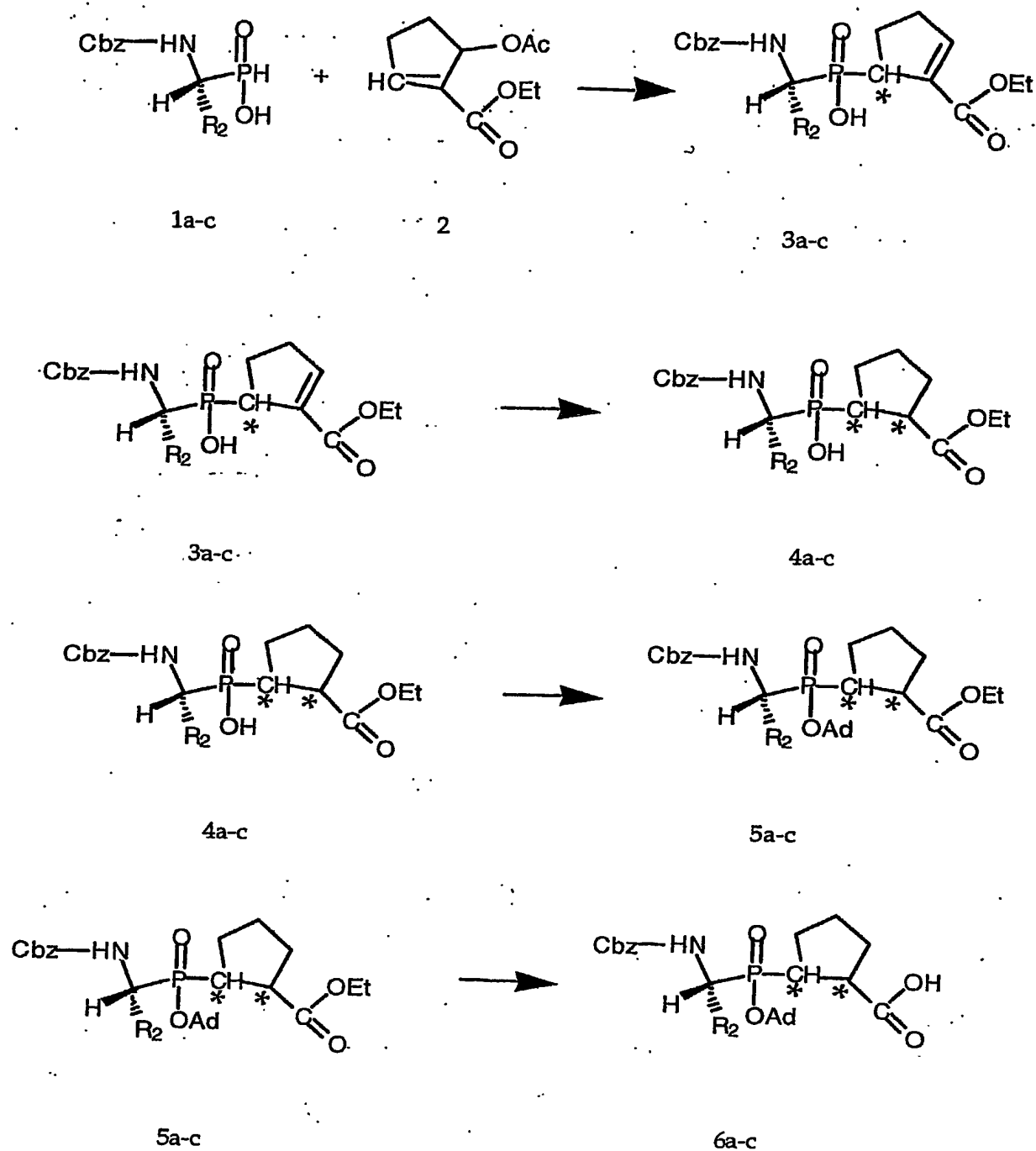


FIG. 1

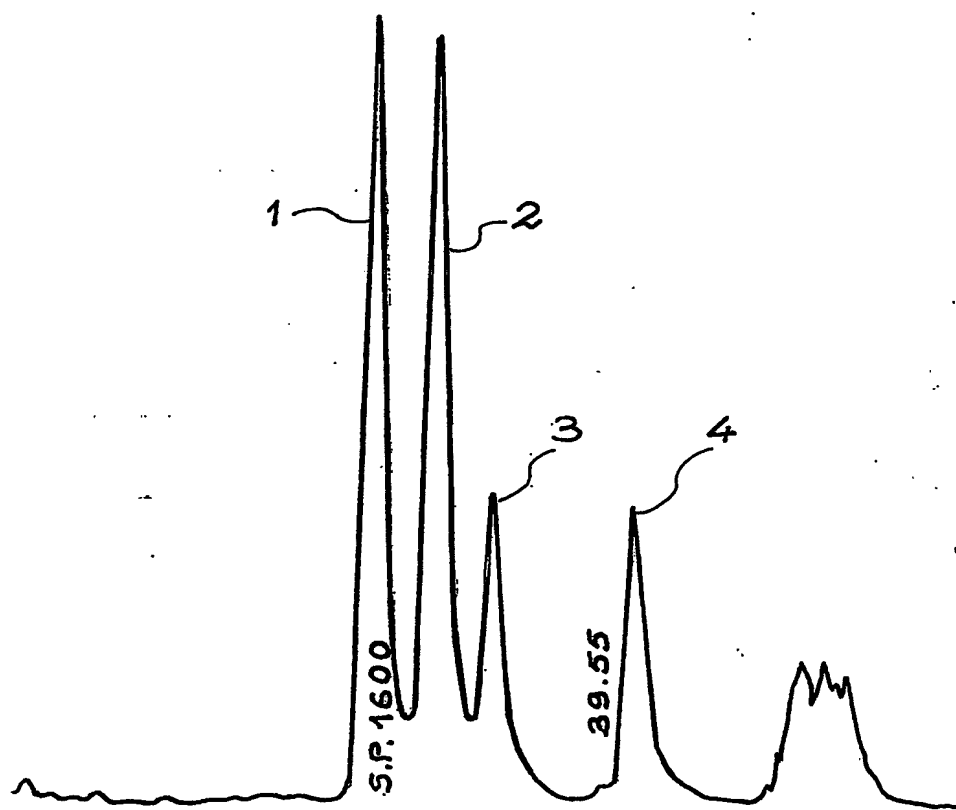


FIG. 2

3 / 3

FIG. 3

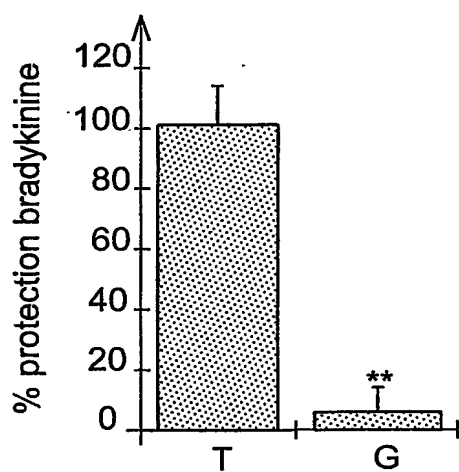
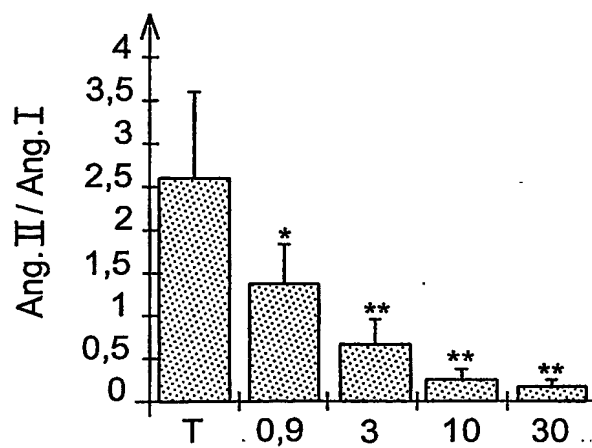


FIG. 4

FIG. 5

